

① 公表特許公報 (A)

昭63-502117

④Int.Cl. ¹	識別記号	序内整理番号	④公表 昭和63年(1988)8月18日
A 61 K 9/10	327	A-6742-4C M-6742-4C 8615-4C Z-8317-4G	審査請求 未請求 子備審査請求 未請求 部門(区分) 3 (2)
/ A 61 K 37/24 B 01 J 13/02			(全 14 頁)

④発明の名称 放出を制御されたリボソーム供給系

④特 願 昭62-501773
 ④④出 願 昭62(1987)2月9日

④翻訳文提出日 昭62(1987)10月12日
 ④国際出願 PCT/US87/00285

④国際公開番号 WO87/04592
 ④国際公開日 昭62(1987)8月13日

④優先権主張 ④1986年2月10日④米国(U S)④828153

④発明者 ロウーヤン, アニー アメリカ合衆国 カリフォルニア ロス アルトス, アネット レーン 1983

④出願人 リボソーム テクノロジー, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 94025 メンロ パーク, ハミルトン コート 1050

④代理人 井理士 山本 秀策

④指定国 A T(広域特許), A U, B E(広域特許), C H(広域特許), D E(広域特許), D K, F R(広域特許), G B(広域特許), I T(広域特許), J P, L U(広域特許), N L(広域特許), N O, S E(広域特許)

請求の範囲

1. リボソーム不透過程化合物を捕捉した形で含むリボソームの懸濁液を形成し、該懸濁液を筋肉内部位または皮下部位に注射することによって該化合物を投与する際に、該部位から血流への該化合物の放出割合を選択的に増加させる方法であって、

該部位に注射されたリボソームの平均サイズを選択的に増加させること、および

該部位に注射されたリボソーム脂質の量を選択的に増加させること。

を包含する方法。

2. 前記化合物がカルシトニン、成長ホルモン、インシュリン、インテーフュロン、およびインテロイキン-2でなる群から選択されたペプチドである、請求の範囲第1項に記載の方法。

3. ホルモンがカルシトニンであり、該ホルモンが懸濁液のリボソーム中に少なくとも約0.10~1.0mg/mlの濃度で被包されている、請求の範囲第2項に記載の方法。

4. 前記リボソームに対して、負に荷電したリン脂質の量を減少させて、前記注射部位からの前記化合物の放出割合を増加させることを、さらに包含する、請求の範囲第1項に記載の方法。

5. 前記捕捉された化合物を含む前記リボソームの平均チ

イズが約0.2ミクロンより小さく、そして平均チイズが約0.5ミクロンよりも大きな空のリボソームの添加量を増加させることによって、前記捕捉されたリボソームの平均チイズが選択的に増加される、請求の範囲第1項に記載の方法。

6. リボソーム不透過程化合物を筋肉内注射部位または皮下注射部位から血流へ投与する際に用いるリボソーム組成物であって、

該化合物を捕捉した形で含み、平均粒子チイズが約0.3ミクロンより小さなりボソームの水性懸濁液、および

このような注射部位からの該化合物のクリアランス半減期を、所望の半減期である約1~14日まで延長するのに有効な量で該懸濁液中に含まれる、ある量の空のリボソーム、を含有する組成物。

7. 前記空のリボソームの平均粒子チイズが約0.5ミクロンより大きい、請求の範囲第6項に記載の組成物。

8. 前記化合物がカルシトニン、インシュリン、成長ホルモン、インテーフュロン、およびインテロイキン-2でなる群から選択されたペプチドである、請求の範囲第6項に記載の組成物。

9. ホルモンがカルシトニンであり、前記リボソームの被包空間内のホルモン濃度が少なくとも約1mg/mlである、請求の範囲第8項に記載の組成物。

10. 前記リボソームがヨートコフェロールを少なくとも約0.2モル%の量で含む、請求の範囲第6項に記載の組成物。

放出を制御されたリボソーム供給系

1. 発明の分野

本発明は、リボソームを基本とする系および制御された速度で血流へ薬物学的に活性な化合物を供給するための方法に関する。

2. 簡略文獻

1. Abra, R.H., ら, *Res Commun Chem Path and Pharm.*, 37:199 (1982).
2. Fukunaga, M., ら, *Endocrinology*, 115(2):757 (1985).
3. Greenwood, P.C., ら, *Biochem J.*, 89:114 (1963).
4. Jackson, A.J., *Drug Metab and Dispos.*, 9(6):535 (1981).
5. McParlane, A.S., *Nature*, 182:53 (1958).
6. Szoka, F., Jr., *Proc Natl Acad Sci. USA*, 75:4194 (1978).
7. Szoka, F., Jr., *Ann Rev Biophys Biophys*, 9:487 (1980).

3. 発明の背景

リボソーム供給系が、薬剤やペプチドホルモンのような、種々の薬物学的活性な化合物について提案されている。非經

口投与される化合物について、リボソームは、長期間にわたり制御された“封入物”的放出を供給し、そして血流中の薬物化合物の血漿ピークレベルを制限することにより毒性のある副作用を抑える力を有する。これらの兼ね合えられた長所は、化合物をより少ない回数およびより高い投与量レベルで投与することを可能としており、それによって治療の便利さが増す。

非経口投与のために広く提案されているリボソーム投与の経路の1つに、静脈内(IV)注射がある。この経路によって投与されるリボソームは、一般に細胞内液系(BSS)により除去され(cleared)。その結果、リボソームはBSS細胞に富む肝臓、脾臓および肺のような器官に集中する傾向がある。リボソームをBSSに富む組織にある程度特異的にみちびく能力は、例えば、肝臓、脾臓または肺の病気の治療に対して有利である。この方法は、例えば、米国特許出願“リボソーム／アントラキノン薬剤の組成物および方法”(1985年12月6日出願の特許出願第806084号)に記載されている。この特許出願には、リボソームに捕捉されたドキソルビシンによる肝臓癌の治療のための改良された治療法を記載している。しかし、投与すべき化合物をBSSに富む組織以外の部位に用いようとする場合、特にもし血流への長期間の放出が必要とされるときには、IV投与はしばしば使用が限定される。

リボソームに捕捉された化合物の筋肉内(IN)または皮下(SQ)投与もまた、提案されている。この方法は、リボソ-

ムが注射部位に存在する限り、BSSによる迅速な取り込みと除去(クリアランス: clearance)はおこりえないという利点を有する。注射部位に固定されたリボソームは、その後捕捉された化合物を長期間にわたりて血流へ放出することができる。その例として、英国特許出願第2,050,287号には、SQ注射部位からインシュリンをゆっくりと放出するために意図されたリボソーム系が示されている。ごく最近、IN投与部位からのリボソームに被包されたカルシトニン放出のための系が提案されている(Fukunaga)。

前述のタイプのINまたはSQ放出系においては、注射部位からのリボソームに捕捉された化合物の放出速度を制御できることが望ましいであろう。しかし、注射部位からの薬剤放出速度に影響する要因を理解し、制御しようとする従来技術の試みは、限られた成果しかあげていない。これらの研究の難しさの原因の1つは、捕捉された化合物のリボソームからの放出に影響する因子から、注射部位におけるリボソームの分解速度および/または放出速度に影響する因子を分離するという問題である。例えば、もし、リボソーム透過性薬剤が研究されるならば、血流中への薬剤放出速度と、注射部位でのリボソームの安定性とはほとんど独立した関係であり得る。

今日までに報告されているひとつの研究においては、IN注射部位からのリボソームに捕捉されたインシュリンの放出における、いくつかのリボソームの回数の効果が調べられていた(Jackson)。その結果の概略は次のとおりである:(a)より

小さいリボソーム (0.15~0.7ミクロン) は、より大きいリボソーム (0.3~2.0ミクロン) よりも、リンパ液によってより迅速に取り込まれる；そして¹¹放射されたリボソームの総量が減少するにつれ、注射部位からリボソームの吸収はより遅くなる。これらの結果 どちらも、次の事項を予測していない。つまり¹¹部位へ投与されたリボソームから、リボソーム非透過性の物質（例えばペプチド）が放出される速度をどのようにして制御するのか、ということを予測していない。さらに、ヒトの治療に使用するために、どのくらい大きなリボソームが濾過された形で回収され得るのか、ということも明らかではない。

4. 発明の要約

それゆえ、¹¹または⁵⁰部位からのリボソーム非透過性化合物の放出速度を、選択された方法で制御するための系と方法とを提供することが、本発明の一般的な目的である。

本発明の他の目的は、ヒトに¹¹または⁵⁰投与するのに適した無菌的な形で容易に調製し得る、そのような系を提供することである。

本発明のさらに他の目的は、制御された放出速度での非経口的なホルモンの供給に用いられる、安定なリボソーム／ペプチドホルモン組成物を提供することである。

本発明は、血液へのリボソーム非透過性化合物の放出速度を選択的に増加させる方法を含む。その化合物は、該化合物

を捕捉する形態で含有するリボソーム懸濁液を形成し、¹¹または⁵⁰部位へこの懸濁液を注射することにより投与される。注射部位からの物質の放出速度は、該部位に注射されたリボソームの平均サイズやリボソーム濃度の懸性射量を増加することにより、選択的に増加する。カプセル化された物質は、インシュリン、成長ホルモン、カルシトニン、インターフェロン、インターロイキン-2 ようなペプチドでありうる。このペプチドは、制御された速度で数日間にわたり血流中へ有利に放出される。

リボソームに被包された物質の放出速度もまた、リボソームの脂質組成を変えることにより制御され得る。ホスファチジルグリセロール (PG) のような、負に荷電したリン脂質は、放出速度を減少するように作用し、コレステロールは速度を増加するように作用する。

ひとつの実施態様においては、リボソームは次の方法により調製される：まず、化合物をカプセル化した小さなリボソームの懸濁液を調製し、該懸濁液中からカプセル化されていない化合物を除去し、その懸濁液を濾過滅菌し、そして、所望のリボソームの平均サイズおよび濃度になるまで、この懸濁液に無選択的に調製した空のリボソームを加える。小さなリボソームは約 0.3ミクロンを下まわるサイズが好適である。空のリボソームは 0.5ミクロンかそれ以上が好適である。

本発明はまた、¹¹または⁵⁰注射部位からの血液へのリボソーム非透過性化合物の投与のためのリボソーム組成物を含む

する。この組成物は、物質を捕捉した形態で含有し、粒子のサイズの平均が約 0.3ミクロンを下まわるリボソーム、およびこのような注射部位からの物質の除去の半減期を約 1~14 日の間の所望の半減期へと増加させるのに有効な量の空のリボソームを有する、リボソームの懸濁液を含む。空のリボソームのサイズ、脂質組成、および相対量は、注射部位からカプセル化した物質が所望の放出速度で供給されるように選択される。

さらに他の面では、本発明はリボソーム／カルシトニン (CT) 組成物を含む。この組成物は、少なくとも約 0.2モルパーセントのロートコフェロールを有する濾過されたリボソーム懸濁液、およびリボソームの被包空間に少なくとも 0.1~1 mM/ug の濃度でリボソームに捕捉された CT を含む。その組成物は、懸濁液中に存在する第二鉄の量よりも過剰のモル量でフェリオキサミンが存在することによりさらに安定化する。

本発明のこれらおよびその他の目的と特徴は、次の本発明の詳細な記述を添付した図とともに読むと、より十分あらかじめになるであろう。

図面の簡単な説明

第1図は、空の脂質およびペプチドを被包する脂質の両方を含むリボソーム組成物の調製に用いられる、加工方法の流れ図である：

第2図は、¹¹注射部位からのリボソームのトレーサー脂質の放出のカイネティクス (Kinetics) (丸印)、および注射された動物から分離されるトレーサーの蓄積 (三角印) を示す：

第3図は、第2図のトレーサー放出データ (破線)、および小さいサイズのリボソームを有するリボソーム組成物からの蓄積のトレーサー放出データ (實線) の片対数プロットである：

第4図は、¹¹注射部位からのカプセル化された放射活性カルシトニン (CT) の放出のカイネティクス (丸印)、動物から分離されるホルモンの蓄積 (三角印)、および注射部位からの遊離CTの放出 (四角印) を示す；そして、

第5図は、第4図からのCT放出データの片対数プロットである。

発明の詳細な説明

1. リボソーム組成物の調製

A. 脂質成分

組成物中のリボソームは、標準的な小胞形成性脂質から形成される。その脂質は、通常、中性および負に荷電したリン脂質、およびコレステロールのようなステロールを含む。脂質の選択には、通常、次の事項が考慮される：(a)所望のリボ

ソームサイズおよびリボソームのサイズ調整の容易さ、および倒リボソーム注射部分からの脂質およびホルモンの放出速度。

典型的には、リボソーム中 主要な脂質成分はホスファジルコリン (PC) である。種々の直長および飽和度を有する種々のアシル鎖基を持つPCが入手可能で、もしくは既知 方法により単離または合成され得る。一般には、ほとんど飽和していないPCがより容易にサイズ調整される。特に透過装置の用途のため、リボソームが約0.3ミクロンを下まわるサイズに調整されなければならないときにはそうである。サイズ調整に用いられる方法および透過装置用リボソームは以下に述べられる。アシル鎖の飽和効果は、リボソームが静脈内に投与される場合よりは、薬剤放出速度に影響を与えないようであるが、リン脂質のアシル鎖組成はまた、リボソーム脂質および捕捉された化合物の注射部位からの除去速度に影響を与える。1つの好ましいPCは、卵の脂質に由来する卵PC (EPC) であり、これは、飽和および不飽和のアシル鎖基の混合物を含む。

本発明に基づいて行い、以下の実施例ⅢおよびVで報告されている実験は、次の事柄を示す。つまり、負に荷電したリボソームは、PC単独でもしくはPC/コレステロール混合物から生成したリボソームと比べると、脂質および捕捉されている化合物のIN注射部位からの除去速度を有意に増加させるということを示す。この研究では、選択されたモル比のPGを用い

て生成するリボソームを含むが、ホスファジルセリン (PS) およびフォスファジルイノシドール (PI) のような負に荷電した他のリン脂質も使用することが可能であった。既報されるPGの効果は、部分的には、自然に起こるリボソームの会合を阻止する荷電性 脂質の能力に関係するようである。実施例IVに報ずるよう、1ミクロン孔径のポリカーボネート膜を通して押出すことによりサイズ調整した後にリボソームのサイズを測定すると、PCを含むリボソームが約1ミクロンという安定なサイズを有する。これに対して、PCのみを含むリボソームは、約3~5ミクロンの間の粒子サイズを有することが示される。以下に見られるように、そして本発明方法の1つの重要な実施態様によれば、より大きなリボソームサイズが、IN注射部位においてより長い薬剤の放出を示す。

実施例IVおよびVで示される事実は、負に荷電したリン脂質もまた、リボソームのサイズに関係しない構造により、そのまま脂質および薬剤の放出を増加させ得ることを示す。簡単に述べれば、純粋なPG (プラス少量のセートコフェノール) を含むリボソームについては、PCを5または10モルパーセントの割合のみで含む場合のサイズのリボソームよりも、脂質トレーサーおよび放射標識されたカプセル化ペプチドが、速く除去されることが示された。種々のアシル鎖成分を有し、負に荷電したリン脂質が入手され得る。1つの好ましい脂質は卵PC (EPC) であり、これは飽和および不飽和のアシル鎖組成の混合物を含む。

添加されたコレステロールの、薬剤と脂質との放出 (IN注射部位からの) におよぼす影響もまた調べられた。一般に、コレステロールはリボソームの安定性を増加させることが知られており、そのため、IN部位からの脂質および捕捉された成分の除去に要する時間を増加させることが期待され得る。実施例Vで報告されるように、約6~4のモル比でPCおよびコレステロールを含むリボソームは、純粋なPCリボソームよりも、被包されたペプチドの放出時間が約20%長くなることが示された。しかし、PSを含むリボソームにコレステロールを加えても、脂質またはカプセル化されたペプチドの注射部位からの放出速度には、ほとんど変化がなかった。

B. 保護剤

リボソームの脂質成分は、過酸化および過酸ラジカル反応を促進することが知られている。これらの反応はリボソームの分解を促進する。この問題は、「アントラキノン/リボソーム組成物および方法」という上記の特許出願において充分に述べられている。簡単に述べれば、その出願には、脂質の過酸化的なおよび過酸ラジカルによる損傷によりリボソーム/薬剤組成物中の脂質および捕捉されている薬剤成分の両方が劣化すると報告されている。脂質および薬剤成分に対する過酸ラジカルによる損傷の程度は、セートコフェノール (セト) のような親油性の過酸ラジカル消去剤が小胞を形成している脂質中に含まれていると、有意に減少した。興味あるこ

とに、脂質損傷および薬剤修飾における有意の減少が、次の場合に観察された。つまり、脂質/薬剤組成物が、セト、およびフェリオキサミンのような水溶性の鉄特異的キレート剤の両方の存在下において処方された場合に、既報された。フェリオキサミンは6配位度で鉄イオンに強固にキレート結合し得るので、その化合物は、リボソーム脂質の水相で、鉄触媒による過酸化を阻止するように作用しそうである。2つの保護剤の効果は共に、次の事柄を示唆する。つまり、水相で起こる鉄触媒による過酸化反応、および過酸ラジカル反応 (脂質で増強される) の両者が、脂質の過酸化的な損傷に対して重大に寄与する、ということを示唆する。

この組成物に用いられる親油性の過酸ラジカル消去剤は、好ましくはセト、もしくは医学的に許容され得る類似物またはそれらのエステル (例えば、コハク酸セートコフェノール) である。その他の過酸ラジカル消去剤には、ブチル化ヒドロキシトルエン (BHT)、没食子酸プロピル (Ascorbate)、およびそれらの医学的に許容され得る塩および類似物が含まれる。リボソーム中で、効果的なレベルで、ヒトに非経口投与し得る付加的な親油性の過酸ラジカルの消去剤がまた、リボソーム内の効果的なレベルで使用され得る。この過酸ラジカル消去剤は、典型的には、従来の手法によりリボソームを調製するのに用いられている脂質成分に含まれる。保護化合物の好ましい濃度は、リボソームを構成する全脂質成分の約0.2から2モルパーセントの間である。しかし、より高濃

度の化合物（特に α -Tまたはそのコハク酸エステル類似物）が、リボソームの安定性に適合し、薬学系に受容される。

水溶性の鉄 興的キレート剤は、天然および合成のトリヒドロキサミン酸のクラスより選択される。このキレート剤は、第2鉄イオンに対する非常に高い結合定数（ 10^{11} のオーダー）で、そして、2価の陽イオン（例えば、カルシウムおよびマグネシウム陽イオン）に対して比較的低い結合定数を有することによって特徴づけられる。種々の天然起源のトリヒドロキサミン酸が知られている。それらには、フェリクロム、フェリクロムA、およびアルボマイシンのようなフェリクロムクラスの中の化合物；フェリオキサミンおよびフェリオマイシンを含むフェリオキサミンクラスの化合物；そしてフタルアミンのクラスの化合物が含まれる。

1つの選ましいキレート剤はフェリオキサミンBであり、このフェリオキサミンBは、また、フェリオキサミン、デスフェリオキサミン、デスフェリオキサミンBおよびDesferriol™として知られている。この化合物は例外的な鉄結合親和性を示し、鉄肝疾患や鉄中毒の治療でヒトに対して非経口の用途では安全であることが実証されている。

上記キレート剤は、リボソーム懸濁液中に第2鉄が過剰である程度で、組成物中に存在する。典型的には、リボソームの調製に用いられる水溶性の液体は少なくとも約1～2ヶ月の第2鉄を含み、そして、100μMまたはそれ以上の第2鉄を含有し得る。約20μMまでの鉄を含む水溶性の液体には、約

50μMのキレート剤の濃度が好ましい。

キレート剤は、好ましくは、リボソーム形成時に小胞を形成する脂質に加えられ、それにより、リボソーム調製中に、脂質により促進される脂質の酸化的損傷から脂質が保護される。キレート剤の水溶性液体を加えることによるリボソームの調製方法は以下に記載される。ここでは、次の事項がわかる。つまり、この方法で形成されたリボソーム懸濁液のみが、キレート剤を、大部分を占める水相に、そして、カプセル化された懸（つまり水溶性のリボソーム内部領域）の両方に含む、ということがわかる。あるいは、キレート剤は、リボソームの形成後、懸濁液中に含有され得る。

C. 摘選された化合物

リボソームに摘選された化合物は、リボソーム不透性の薬剤またはペプチドである。そのリボソーム外への拡散速度は、IH注射部位でのリボソームの崩壊速度よりも実質的に高くはない。その試薬は、親油性薬剤またはホルモン、または水溶性の薬剤またはペプチドであり得る。上記親油性の薬剤またはホルモンは、その油/水の分配が著しくリボソームの2重層の相方に傾いており、上記水溶性の薬剤またはペプチドは、リボソーム2重層を通過して（拡散することがあったとしても）、ゆっくりと拡散させることが可能である。リボソーム外へ自由に拡散でき、半減期が数時間を下まわる水溶性の薬剤は、本発明からは特に除外する。

ペプチドホルモンおよび免疫活性化剤は、本発明で用いる化合物の1つの重要なクラスである。代表的なペプチドホルモンには、インシュリン、成長ホルモン、およびカルシトニン（CT）が含まれ。これらは、カルシウムの血中レベルを制御する。インクーフェロンおよびインターロイキン2は免疫活性化剤の代表である。本発明によれば、選択されたペプチド化合物をゆっくりとした調節された速度で数時間から数日間にわたり血流中へと放出することが可能となる。そのため、選択ホルモンの投与に特徴的である血中ペプチドレベルの大きな変動が回避される。

さらに、そして本発明における1つの発見によれば、ペプチドが比較的低濃度で存在している場合には、キャリアリボソームは、肝臓にあたって該ペプチドの安定性を有意に増強し得る。実施例2に報告する実験は、選択型のCTの安定性が、CT濃度が0.010mg/mlから1.0mg/mlに上昇すると、数倍増強されたことを示す。リボソームに比較的高い濃度（例えば1mg/ml）でカプセル化されており、しかし大部分を占める相の濃度が比較的低い（例えば、0.010mg/ml）状態で存在するCTは、高濃度の選択のホルモンで見られるのと同様の安定効果を示す。従って、本発明によれば、高濃度でより安定であるCTのようなペプチドホルモンが、比較的希釈された形で肝臓されそして選択される。その状態においては、該ホルモンの高濃度の微量環境により、肝臓に康して良好な安定性が付与される。CTのような水溶性のペプチドを、選択された

内部容積濃度でカプセル化するリボソームの調製が次に検討されている。

ステロイドホルモンおよび抗炎症剤は、本発明で有用な他の重要なクラスである。代表的なステロイドには、ヒドロコルチゾン、エストラジオール、およびチストステロンが含まれる。摘選されたステロイドを含むリボソームは、該化合物を小胞を形成する脂質中に包含させることによって容易に処方される。ステロイドのIHまたはSG注射部位からの放出速度は、薬剤の分配親度、および注射部位でのリボソームの安定性および注射部位からの移動により制御される。

IHまたはSG部位からのゆっくりとした放出リボソームの選択に適した他のタイプの化合物には、アンホテラシンBのような抗生素質、シクロスボリンのような免疫抑制剤、およびドキソルビシンのような抗腫瘍剤が含まれる。1985年9月27日に出願された共同出願の特許出願第781,395号「アンホテラシンB／リボソーム組成物」には、安定なリボソームサイズに適合する形の（該脂質の20モルパーセントまでの）高いモル比のアンホテラシンBを含む新規リボソーム組成物が開示されている。抗生素質または抗腫瘍剤の選択について特に有利な本発明の1つの特徴は、薬剤放出部位および最も高い薬剤濃度を選択する能力である。

（以下余白）

D. リボソームの調製

リボソームの調製には、多様な方法を用い得る。これらの方法に関しては、Szoka(1980)によって詳細な説がかれている。ある好ましい方法では、不均一なサイズの多重ラメラ小胞(HLV)が調製される。この方法においては、脂質親和性の遮離基(遮離ラジカル)保護剤を含む小胞形成脂質、およびもし適当なら、脂質親和性の調剤混合物を、適当な有機溶媒または溶媒系に溶解し、真空または不活性気体下で乾燥させて脂質薄膜を形成させる。必要に応じて、この膜は第三ブタノールのような適当な溶媒に再び溶解し、次いで凍結乾燥させて、より容易に水和される粉末状のより均一な脂質混合物を形成させ得る。この膜は、水和媒体で覆って、攪拌することにより典型的には15~60分間かけて水和させる。得られる HLVのサイズ分布は、より激しい搅拌条件下で脂質を水和させることによって、より小さなサイズに変化させ得る。

ペプチドホルモンのような被包水溶性化合物を有するリボソームを形成させる場合、この化合物は最終的なリボソーム遮離液中のリボソームの内部容積における所望の濃度で水和媒体に溶解させる。従って、例えば約1mg/mlの内部空間濃度でCTが被包されているリボソームを形成させるためには、水和媒体は1mg/mlのCTを含有する。この水和媒体は、約10~50mMの間の好ましい濃度で特異的なキレート剤を含有するようにも調製し得る。実施例1には、CTが被包されている HLVの遮離液の調製方法を記述する。

リボソームの遮離に対して優れた方法であって感熱性の被包材料を含むリボソームを遮離するために用い得る唯一の方法は、通常の深さのフィルター、典型的には0.22ミクロンのフィルターを用いた通過によるものである。この方法は、最初にリボソームのサイズを約0.2~0.3ミクロンまたはそれ以下に小さく調節している場合のみ、処理量が高く実験的な基準に基づいて実施し得る。

リボソームをこのサイズの範囲にまで小さくするのに有用な技術にはいくつかある。リボソーム遮離液を浴槽中の音波処理またはプローブを用いた音波処理のいずれかで音波処理すると、サイズが約0.05ミクロンより小さな小胞ラメラ小胞(SUV)への顯著なサイズ減少が生じる。均質化は、別の方法であって、剪断エネルギーによって大きなリボソームをより小さなものに断片化する。典型的な均質化法においては、HLVを標準的な乳剤ホモジナイザーに通し、過度にリボソームサイズ、典型的には約0.1と0.5ミクロンの間のサイズが観察されるまで再処理する。両方の方法において、粒子サイズの分布は、通常のレーザービームによる粒子サイズ識別法でモニターし得る。

リボソームを小孔ボリカーボネット膜に通して押し出すことは、リボソームサイズを比較的良く規定されたサイズ分布へと減少させる効果的な方法である(Szoka 1978)。典型的には、所望のリボソームサイズ分布が達成されるまで、遮離液を数回膜に通して濾過させる。リボソームを通常的に、よ

もう一つの有利なリボソーム製造方法は、Szoka(1978)によって記述されている逆相発泡法である。ここでは、有機溶媒または溶媒系中 小胞形成脂質の溶液を、油中水型乳剤と適合するような相対的容量で、被包されるべき材料の水溶液に添加する。次いで、この混合物を乳化し、有機溶媒を除去することにより、水滴が被包されている脂質單層構造より成る逆相脂質ゲルを調製する。このゲルは、水溶液に再溶解させると、一般に逆落発小胞(BEV)と呼ばれている比較的大きなオリゴラメラ小胞の遮離液を形成する。この方法は、高い被包効率、典型的には添加された全水溶性材料の約30~40%の効率を有する。従って、高価な調剤、またはペプチドホルモンのようなペプチド化合物の被包に有用である。

使用する方法に關係なく、リボソーム調製は、好ましくは無菌リボソーム遮離液になるような条件下で実施される。これは、この方法の間に後述の滅菌技術を用いることによって行われる。

E. リボソームのサイズ調整

最初のリボソーム調製が無菌条件下で行い得るとしても、一般的には遮離の調剤を除去するためには調製物を処理することが必要であり、このような処理は、一般に無菌的に実施することが困難な方法を含むしている。従って、これらのリボソームが非経口注射に使用し得るようになる前に、最終的な滅菌が要求される。

り小さな孔の膜に通して押し出し、リボソームサイズを徐々に減少させ得る。

F. 遮離の調剤の除去

上述した BEV法のような最も効率の良い被包法でさえ、水溶性化合物の最大被包化効率は約50%である。従って、初期段階のリボソーム遮離液は、50%またはそれ以上の該化合物を遮離した(被包されていない)形で含む。被包化効率が約10~20%の間であるのが典型的な、上述の HLV法によって形成されたリボソーム遮離液は、被包されていない材料の量がさらに多い。実施例Vで報告されている研究は、遮離の(被包されていない)ペプチドが、リボソームに被包された化合物については数時間から数日間であるに比較して、1時間より早くIN注射部位から取り除かれることを示している。従って、注射部位からの急速な調剤放出の効果を最少にするためには、注射された組成物中に存在し得る遮離の調剤を除去することが重要である。

リボソーム遮離液から被包されていない化合物を除去するのに有用な方法がいくつかある。ある簡単な方法では、遮離液中のリボソームを高速遠心分離によってペレット化し、遮離の化合物および非常に小さなリボソームを上清中に残す。別の方法では、紫外線により遮離液を破壊し、破壊されたリボソームを、調剤を含まない代わりの媒体中に再溶解することを包含する。あるいは、より大きなリボソーム粒子を増

質分子から分離するためにゲル通過を用い得る。

遊離の化合物を除去するさらに別の方法では、イオン交換、分子ふるい、またはアフィニティクロマトグラフィーを利用する。ここでは、遊離した形の化合物とは結合するが、捕捉された形の化合物とは結合しない樹脂、あるいは被包されていない化合物に特異的に結合する、例えば抗生物質のような結合分子を付着させた担体を含むカラムにリボソーム懸濁液を通す。この方法は、樹脂を適当に選択することにより、遊離の発熱因子を除去することにも効果的であり得る。

遊離の薬剤を除去するための処理に統いて、リボソーム懸濁液を10段与または50段与で用いるのに適当な濃度にする。これは、リボソームが、例えば遠心分離または離心分離によって濃縮されている場合には、このリボソームを適当な量の担体に再懸濁すること、あるいは薬剤除去工程が懸濁液の全容量を増加させる場合には、この懸濁液を濃縮することを包含し得る。次いで、この懸濁液は、上述のように通過によって濃縮する。

C. リボソームの加工

第1図は、本発明のリボソーム組成物を調製するのに適したリボソーム加工の作業工程図である。図中の左側の作業工程は、捕捉された化合物を有するリボソームの無菌懸濁液を形成させる工程を示している。上で詳述した、これらの工程は、濃縮された捕捉濃度の化合物を含むリボソーム懸濁液を

まず調製することを包含する。次いで、最後、懸濁液を考慮して、この懸濁液は0.2~0.3またはそれ以下にサイズを縮小する。捕捉されていない薬剤を除去した後、この材料を所定の脂質濃度にし、濃縮により濃縮する。

第1図の右側の列は、空のリボソームを調製する際に用いる平行した工程を示している。空リボソームを調製する原理は、リボソームに被包された材の、10または50段射出部位からの放出割合が、(a)脂質組成、(b)平均リボソームサイズ、または(c)注射されたリボソームの全脂質量を変更することによって選択的に変化させ得るという発見に基づいている。これらのパラメーターと化合物放出割合の間の関係は、以下の第3節および実施例Ⅲ~VIで詳述される。ここでは、上記部位に注射されたリボソームの大部分が、捕捉された化合物を含んでない場合でさえ、これらの結果が達成されるということに注目すれば十分である。すなわち、化合物放出割合に対する脂質の組成、サイズ、および量の効果は、空のリボソームおよび化合物含有リボソームに同じように影響を与えるリボソーム/リボソーム相互作用に依存するようである。

脂質の組成、サイズ、および量を変化させる方法としての空のリボソームの利点は、それらが最終的な濃縮工程を必要とせずに無菌の形で調製し得ることである。主として、遊離の化合物を懸濁液から除去することが必要なために、リボソーム調製物の無菌性が損なわれることが想い出される。化合物が存在しないか、あるいは相対量の遊離した化合物を

生じさせないような量の化合物の存在下でリボソームを形成させることにより、最後の濃縮工程を回避し得る。空のリボソームは、濃縮のためにサイズを小さくしなくてよいので比較的大きなリボソームを添加することにより、化合物放出割合において、より大きなサイズに濃縮した効果を達成し得るのが重要な利点である。

第1図の右側に示した工程を考慮すると、空のリボソームを、必要に応じて処理し、より小さなリボソームを除むし得る。これは、例えば、容器中により大きなリボソームを固定し、固定されなかつた材料を無菌的に除去することにより行い得る。あるいは、これらのリボソームは、さらに処理することなく、フィルター濃縮したリボソームに直接添加することにより、濃縮された平均脂質組成、サイズ、および濃度を有する最終組成物を調整し得る。またはこれらのリボソームは、フィルター濃縮したリボソームに添加する前に、無菌条件下で、1ミクロンのポリカーボネート膜に通して押し出すことによって、そのサイズを調整し得る。

従って、上述の加工法は、(a)濃縮された捕捉化合物濃度を有し、(b)遊離の化合物をほとんど含まないか、または全く含まない、そして(c)濃縮された放出割合で、射出部位から、捕捉された化合物を放出させる平均のリボソームサイズ、濃度および組成を有する無菌リボソーム組成物の調製を可能にする。

2. 組成物の特性

A. 安定性

本発明のある有利な特徴は、リボソームに被包されることによってペプチドホルモンのような生理学的化合物の安定性が増大することにある。特に、CTに対して見い出されているように、このような化合物が被包された形でより安定である場合には、リボソームに被包されることによって、この化合物は懸濁液中に安定な形で保存され得る。該懸濁液中では、この化合物は局所的な高濃度を有するが、全濃度は比較的低い。例えば、実施例Ⅲに報告されている研究によると、担体タンパクの存在下でさえ、濃縮のCTは0.01mg/mlより1mg/mlの方が実質的により安定である。内部容量濃度は1mg/mlであるが、懸濁液濃度は0.01mg/mlで、ペプチドがリボソーム内に被包されている場合、このペプチドは高濃度CTの安定特性を示す。

リボソームの安定性は、脂質親和性の遊離基捕捉剤、例えば-Tを少なくとも約0.2のモル比で含有させることにより向上する。さらに、組成物の安定性は、フェリオキサミンのような強特異的キレート剤を、リボソーム懸濁液中の遊離第二族の量より過剰のモル数で添加することにより達成され得る。CT/リボソームは、上記のように、サイズを調整され、遊離CTを除去する処理が施され、そして濃縮濃縮され得る。得られた組成物は、(a)少なくとも約0.2モル%の-Tを含

むリボソームの細胞水溶液、および少なくとも約1mMの濃度でリボソーム内に捕捉されたカルシトニンを含有する。追跡のCT濃度は、被包ペプチド 約10モル%より小さいことが好ましい。

リボソームに被包されることによってCT ようなペプチドホルモンが安定な希釈された形で保存されるという発見は、様々な他のペプチドやタンパクに応用される。例えば、この方法は、酵素を安定な希釈された形で保存するのに用い得る。

B. 腫瘍および被包化合物の放出特性

腫瘍および被包化合物のIR照射部位からのクリアランス(除去)の割合を実施例Ⅳ～Ⅵに報告されているように調べた。これらの研究の目的は2つある: (1)照射部位からの腫瘍クリアランスおよびペプチドクリアランスの間の関係を決定すること、および(2)ペプチド放出割合に影響を及ぼすリボソームの変数を調べることである。これらの研究は、モデルペプチド化合物としてCTを用いて行われたが、血液中に放出されるためにはリボソームの破壊が必要であるようだ。いかなる水溶性化合物にもこの発見を応用し得るということが認識される。

IR照射部位からのリボソーム腫瘍クリアランスの割合を追跡するために、トレーサー腫瘍として¹²⁵I-標識フェヌフタジルエタノールアミン(¹²⁵I-PB)を含むリボソームを実験動物の股に注入した。トレーサー腫瘍の配置は、少なくと

も70時間の試験期間にわたって、最低8つの時点で測定された。注射部位から トレーサーの減少(丸印)および排泄されたトレーサーの累積(三角印)を第2図に示す。注射部位からのトレーサークリアランスのデータは、片対数回数としてプロットした場合、第3図で示されるように直線プロットとなり、これから腫瘍クリアランス半減期を計算し得る。この方法の詳細は実施例Ⅱに与えられている。

実験動物にIR照射したりボソームからの放射標識CTのクリアランスは、同様に以下のようであった。典型的な実験から得られた、注射部位からのトレーサーの減少(丸印)および排泄されたトレーサーの累積(三角印)のプロットを第4図に示す。第5図に示されているCTクリアランスの片対数プロットを用いて、照射部位からのクリアランス半減期を計算した。保持されるCTの対数値と時間との間の直線関係は、腫瘍が照射部位から1次の運送路で除去されていくことを示している。注射部位から血液中への追跡のCTの急速なクリアランスもこの図に示されている。

腫瘍とCTのクリアランス割合に対するリボソームサイズの効果は、実施例Ⅳのデータから明らかである。該データは、サイズが0.2ミクロンから約5ミクロンの範囲にわたるリボソームと、より大きなリボソーム(60~100%長い腫瘍クリアランス割合を示す)とを比較したものである。実施例Ⅵのデータは、小さなリボソーム(約0.2ミクロン)からの腫瘍トレーサーのクリアランスが、より大きな非標識リボソーム

(約1ミクロン)を、注射されたリボソームに添加することによって増大せ得ることを示している。後者の結果は、腫瘍クリアランスが平均のリボソームサイズに因縁した累積効果によって支配されており、そして本発明のある局面に従い、より大きな空のリボソームを添加することによって、より小さなリボソームの放出特性を、制御する基盤を該腫瘍クリアランスが形成していることを示している。

腫瘍クリアランスに対するリボソーム投与量の効果も実施例Ⅳに報告されている。そこで考慮されているように、腫瘍クリアランスの半減期は、腫瘍のサイズまたは組成には無関係に、腫瘍投与量が増加すると共に2倍より大きく増大し得る。投与量が増加すると共にクリアランス割合が同様に2倍に増大することは、被包CTに対して見られる(実施例Ⅴ)。興味あることに、同じサイズおよび投与特性を有するリボソームからの、腫瘍およびCTの放出割合を比較すると(実施例Ⅴ)、照射部位からのCTクリアランスは、対応する腫瘍トレーサーのクリアランスよりも約2倍高い。この発見は、リボソームが不安定化され、それに被包された内容物を主に照射部位で放出すること、そして該部位からの腫瘍クリアランスが異なった、より緩慢な機構によって取り扱われるということを示唆している。

IR部位からの腫瘍およびCTのクリアランスに対する腫瘍組成の効果も調べられた。上で考慮され、実施例ⅣおよびⅤで報告されているように、負に荷電したリン脂質、例えばPGを

リボソームに添加すると、IR部位からの腫瘍および被包CTのクリアランス割合が著しく増大される。実施例Ⅳで注目されるように、PG効果は、部分的には、PG含有リボソームに見られるような保護されたりボソーム環境に因縁し得る。

コレステロールは、約40%のモル比では、PG含有リボソームからの腫瘍クリアランスに対してほとんど効果を有さなかつたが、中性のPCリボソームからのCT放出に対して著しい安定化効果——すなわち、より長いクリアランス半減期——を示した。CTは、同じサイズおよび腫瘍組成特性を有するリボソームから腫瘍トレーサーの約2倍の速さで除去されたことにより、リボソーム腫瘍が、被包化合物に作用する機構とは異なる、より緩慢な機構で照射部位から除去されることが確認された。

上の結果は、照射部位におけるリボソームからの被包化合物の放出が、リボソームのサイズ、投与量、および腫瘍組成の変化によって選択的に制御せ得るということを示している。特に、本発明の方法を実施する場合、照射部位からの被包化合物の放出割合は、該部位に注射されたリボソームの平均サイズおよび合計量によって制御される。本発明のある局面では、平均サイズおよび腫瘍量は、より大きな空のリボソームを、興味ある化合物が被包されている、より小さな被包されたリボソームに投与することによって選択的に増加する。

本発明によれば、化合物を含有するリボソームまたは空の

リボソームのいずれか、あるいは両方にコレステロールを添加することによって、より長い放出時間も達成し得る。被包化合物をより早く放出させるためには、さらに更に荷電した脂質、例えばPGを累進的に含むようにリボソームを処方し得る。

3. 投与の使用

本発明のリボソーム組成物は、種々なリボソーム不透性化合物を非経口的に投与するためには有用である。ある重要な応用は、ペプチドホルモンまたは免疫促進剤を、数日間にわたって継続された形で血流中へ投与する際に用いることである。この組成物はペプチド放出の半減期を選択的に変化させることができ、数日までの選択された期間で放出させる。その時、ペプチドは、環状ではなく、また逆順のペプチドの性質を用いた場合に見られるように急速に変動することなく与えられ得る。さらに、従来提案されてきたリボソーム固形物を用いるよりも、より度合の高い制御が達成され得る。

インシュリンおよびCTは、今日、環状の形で経常的に投与されるペプチドの例である。これらのペプチドは両方とも、本発明のリボソーム組成物中に、容易に取り込まれ、該組成物のIN性質によって、数日間にわたって供給され得る。ホルモン供給の例は、本発明の方法に従って、選択された平均のリボソームサイズ、量、および組成を用いることによって調節される。いくつかのペプチド、例えばCTに対して、リボ

ソーム組成物の付加された利点とは、安定性の増大が達成されることであり、これによりこの材料はかなり希釈された形で長期間にわたって保存される。

以下の実施例は、本発明の構造および利用に関する一定の実施態様を記述するものであって、本発明をいかなる様式にも制限することを意図するものではない。

(以下余白)

実施例1

CT/BLVの調製

卵ホスファチジルコリン(EPC)および卵ホスファチジルグリセロールは、Avanti Lipid (バーミンガム、AL)によって供給された。これらの脂質は、薄層クロマトグラフィーによって約99%純度であると判定された。コレステロール(CE)および α -トコフェロール(α -T)は、それぞれReChet Prop. Inc. (イリジアン、ME)およびSigma Chemical Co. (セントルイス、MO)から入手したが、両者の純度は約99%またはそれ以上であった。サケカルシトニン(sCT)は、Armour Pharmaceutical, カンカキー、ILから提供されたものであり、sCTはクロラミンT法 (McFarland)によって¹²⁵Iを用いて¹²⁵I放射標識された。

表1に示される脂質組成物A~Eの1つを含む多重ラメラ小胞(BLV)が調製された。4つの小胞調製物における脂質成分のモル比を表1に示す。表中の値は、各種の小胞調製物を形成する際に用いられた各脂質成分のマイクロモル比を表す。筋肉内性部位からのリボソーム脂質クリアランスの割合を測定する研究では、小胞形脂質もホスファチジルエタノールアミンの放射性ヨウ素標識体(¹²⁵I-PE)トレーナーを含んでいた。このトレーナーを形成するために、卵ホスファチジルエタノールアミン(BPE)の α -ヒドロキシベンズアミドを、Abraによって述べられているように合成し、この化合物をGreenswoodによって述べられているように¹²⁵Iでヨウ

素標識化した。脂質の比放射能は、¹²⁵Iナノモルあたり3.85 $\times 10^4$ cpmであった。ヨウ素標識脂質は、全脂質が0.2~10マイクロモルの範囲の性質に対して¹²⁵Icpmで取り込まれた。

表1

組成物	EPC	BPE	CE	α -T
A	98			1
B	94	5		1
C	49	5	40	1
D		99		1
E	59		40	1

BLVを形成するために、クロロホルム/肝臓溶液中の脂質組成物を試験管または丸底フラスコ中で混合した。クロロホルムをロータリーエバボレーターで除去し、この脂質混合物を α -ブタノールに溶解させた。次いで、ブタノール溶液をドライアイス/アセトンで凍結させ、1度凍結乾燥させた。乾燥脂質を放散のリン酸緩衝食塩水(PBS), pH7.4で水和させた。CT/BLVを量る研究では、水和用緩衝液は、0.2~5mg/mの¹²⁵I-sCT、およびsCTを含有した。

脂質膜は、室温で約15分間搅拌することにより水和され、約0.2~10ミクロンの範囲にわたる不均一なサイズを有するBLV懸濁液を形成した。小胞調製物は、選択された小孔サイズを有するポリカーボネート膜に通して押し出すことによってサイズを調整した。全調製物は、1.0ミクロンのポリカーボ

ガーネット膜に通して押し出し、約1ミクロンの（殺菌前の）初期小胞サイズを有する小胞を製造した。より小さなサイズの小胞を形成する膜には、サイズを調整した小胞を、さらに0.4ミクロンと0.2ミクロンの小孔サイズの膜に通して通して押し出し、初期に0.2ミクロンサイズの範囲内のサイズを有する小胞を製造した。

被包-sCTを含むMLVは、PBSで3回洗浄することによって、非リボソーム関連の遊離の-sCTが除去された。これらの調製物は、リムルスアーベ分解菌分析（Beecham, Inc., セントルイス, MO）によって免熱因子の試験が行われた。

実施例1

リボソーム結合-sCTの安定性

1.0mg/mlの被包-sCTを含む組成物BMLVを実施例1と同様に調製した。これらの小胞を1.0と0.4のボリカーボネートフィルターに通して通して押し出し、PBS中で3回洗浄して遊離の-sCTを取り除いた。これらのリボソームは希釈して濃度を0.010mg/ml-sCTとし、0.45mlの深さの標準的な滅菌フィルターに通過させることによって被包し、そして無菌のNuncバイアルに分別した。0.5% BSAを含むPBS中に遊離の-sCTを0.010mg/mlまたは1.0mg/mlのいずれかで含む滅菌培液もバイアルに分別した。リボソームに被包された-sCT調製物および遊離の-sCT調製物は、表1では、それぞれL-sCTおよびP-sCTと表されている。

P-sCT調製物およびL-sCT調製物の安定性は、上記バイアルを4°C、室温（約24°C）、および37°Cのいずれかでインキュベートし、そして所定期間インキュベートした後に-sCT生物活性を分した後、試験した。試料は、Sigma（セントルイス、MO）から入手した0.5%トリトン-X中で溶解させ、0.5%BSAを含むPBS1mlあたり40mlおよび120mlに希釈した。凍結した標準P-sCTのアリコットを同に処理した。

各試料は8匹のラットで試験したが、4匹のラットには10mlの-sCT(0.25mlの40ml/滅菌液)を、4匹のラットには30ml(0.25mlの120ml/滅菌液)を皮下投与した。対照ラットには、0.25mlのPBS/BSAを投与した。注射して正確に60分後、血液試料を各ラットから採取した。これらの血液試料は、凝固させて血清試料を遠心分離によって採取した。血清中のカルシウムレベルはSigma Chemical Co.（セントルイス、MO）によって供給されたキットを用いて、色素結合分析により測定した。これらの試料の低カルシウム活性は、注射の60分後に、標準曲線から決定した。結果は、各データ値に対する4匹のラットの平均値として表され、表1に与えられている。

（以下余白）

血 液 試 料	[sCT] (mg/ml)	測定		
		濃度 (%)	時間 (h)	活性 (%)
1 P-sCT	0.01	4	128	27
2 P-sCT	1.0	4	128	100
3 L-sCT	0.01	4	128	100
4 L-sCT	0.01	4	215	100
5 P-sCT	0.01	RT	43	40
6 P-sCT	1.0	RT	43	100
7 L-sCT	0.01	RT	43	100
8 P-sCT	1.0	RT	98	61
9 L-sCT	0.01	RT	98	62
10 P-sCT	1.0	37	7	62
11 L-sCT	0.01	37	7	74

最初の3行は、P-sCTの希釈液と滅菌液およびL-sCTの希釈液の4°Cにおける128時間の安定性を比較したものである。明らかに、希釈P-sCTは、この期間にその活性の大部分を失うが、L-sCTは失わない。リボソーム安定化効果は、おそらくリボソームの被包空間内における局所的に高濃度の-sCT(約1mg/ml)によるものである。第4行からわかるように、希釈液中の被包-sCTは少なくとも215日間安定である。

両者のリボソーム保護効果は、室温でインキュベートされた-sCTに見られる。43日のインキュベーション期間で、P-sCTの希釈液は、その活性の約60%を失ったが、滅菌P-sCT調製物および希釈L-sCT調製物は失活を示さなかった。後者の2つの調製物が大体同じ安定性を有することは、室温で98日間インキュベートしたデータ、および37°Cで7日間インキュベートしたデータから明らかである。

実施例2

注射部位からの臍臍クリアランス

ここで報告される研究は、実験ラットにおける筋肉内（IN）注射部位からのリボソーム臍臍クリアランスの割合を調べたものであり、臍クリアランスの割合は放射性臍臍トレーサーによって測定した。実施例1の臍臍組成物A～Dの1つを有するMLVを、0.2, 2, または10マイクロモル臍臍の選択された投与量で動物に注射した。

重量95～110gの雄SDラットを軽度にエーテルで麻酔し、0.2マイクロモルの臍臍を含む20μlを前肢に注射するか、あるいは2～10マイクロモルの臍臍を含む100μlを各ラットの後肢に注射した。16匹のラットを各実験に用いた。ラットのうち2匹を代謝ケージに入れ、尿および糞便中の放射標識の排泄をモニターした。試験期間が70時間から6日間にわたる各実験について、8つの時点を設定した。この8つの時点は、典型的な実験に対する第1回および第2回に明らかであるが、IN部位からの臍臍クリアランスの半減期が、注射後の時間に対する残留放射能の片対数プロットによって決定し得るように選択した（第2図）。各時点では、2匹のラットを血液採取のために麻酔した。2mlの血液を採取し、131Iの放射能を計数した。次いで、これらのラットはCO₂チャレンバー中で窒息死させ、注射した臍を解剖して放射能を計数した。尿と糞便は、実験の間に代謝ケージ中の2匹の動物から採取した。これらの2匹の動物も殺したが、これが最後の時

点となる。そしてまた、計数するために甲状腺、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎、腸、および生殖器を解剖した。残った胴体は、計数前に分解した。放射能レベルを測定し、実験期間の終わりにおける、これらの動物中の残留臓器トレーラーの配置を決定した。

典型的な実験の結果を第2図に示す。上方の曲線(丸印)は、注射部位(肢部)において保持された放射能を示し、投与された初期臓器投与量の百分率で表されている。誤差の経験は、各時点における2匹の動物間の幅を表す。明らかに、注射部位からのクリアランスの半減期は、約40~50時間の間にあり、(次節で考察される)第3図に示すようにデータを片対数プロットすることによって決定される。

尿および糞便中に測定された累積放射能レベルは、図中の黒い三角形で表される。この実験における70時間の実験期間の終わりでの全排泄放射能は、投与された初期投与量の約72%である。残りの計数は、肢(約5%)、胴体(約20%)、および器官(約3%)に分布している。器官に局在している、約3%の残りの放射能のうち、約55%は腎に、約34%は肝臓に、そして肺臓、気管、腎臓、腎、心臓、肺、および生殖器の各々には約5%より少なく見出される。

実験IV

I. 注射部位からの臓器クリアランスに対する リボソームサイズ、投与量、およびリボソーム組成の効果

不一致は、おそらくリボソームの破壊を反映するものであり、リボソーム濃度が高い場合、主として組成物AおよびBのBLVにおいてのみ生じる傾向がある。これらのBLVは負に帶電した脂質(PG)を含んでいない。

ラットに投与される投与量は、注射ごとに20μまたは100μあたりのマイクロモル脂質によって測定された。表中の投与量の欄に示した値は、注射ごとの全投与量である。

表 IV

No.	組成物	サイズ(μm) 押出量 測定値	注射ごとの投与量 (μm/20)	T-1/2 (日)
1	A	1.0	3.2	0.2/20
2	A	1.0	3.2	2/100
3	A	1.0	5.1	10/100
4	BB	0.2	0.23	0.2/20
5	BB	1.0	1.3	0.2/20
6	BB	1.0	1.0	10/100
7	CC	0.2	0.25	0.2/20
8	CC	1.0	1.1	0.2/20
9	CC	1.0	1.0	10/100
10	D	1.0	0.9	10/100

第1列~第3列のデータは、I. 部位からの臓器クリアランスに対する全脂質投与量の効果を表す。明らかに、注射された脂質量が約0.2マイクロモルから10マイクロモルに増加すると、クリアランスの半減期が約2倍増大する。同じ効果は、組成物BのBLV(第5列と第6列)および組成物CのBLV(第8列と第9列)に見られる。

半減期のデータは、臓器クリアランスの割合が大きなりボ

I. リボソーム注射部位におけるトレーラー脂質の保持は、該部位からのトレーラークリアランスの半減期によって測定されるが、リボソームサイズ、組成、および臓器投与量の関数として調べた。クリアランスの半減期は、実施例で述べたように、ラットの注射された肢における放射能減少を、少なくとも70時間の期間にわたって追跡することによって計算した。各実験から、第2図の星丸の曲線のような曲線が得られた。この曲線は、時間と共に注射部位の放射能が減少することを示している。

第3図の上方の点線は、時間の関数として片対数プロットで表された同じデータを示す。このプロットから、注射部位からの脂質クリアランス半減期は、容易に決定され得る。特定の実施例では、半減期(この時点では、脂質が50%保持されている)は48時間である。半減期のデータは、各実験に対する片対数プロットの傾きから決定され以下の表に示す。

リボソームサイズは、表に示すが、これらのサイズは、BLVをサイズ調整する際に用いたポリカーボネート膜の孔の孔のサイズ、および実際のBLVの平均サイズによって表されている。BLVの平均サイズは、Eicosapの粒径分析器(モデル200)によって測定し、標準化されたラテックスビーズで校正した。このようにして、例えば第1行目の注射されたBLVは、1.0ミクロンのポリカーボネート膜に通して押し出すことによって調整されたが、その測定された平均の粒子サイズは約3.2ミクロンを示した。押し出されたサイズと測定されたサイズの

ソームサイズによって著しく増加することも示している。この効果は、第4列と第5列、および第7列と第8列から明らかである。これらの両者は、それぞれ0.2ミクロンと1.0ミクロンのフィルターに通して押し出されたBLVのクリアランス割合を比較したものである。大きなりボソームは、クリアランス半減期を約80~100%だけ増加させた。組成物AのBLVに調整された比較的大きいクリアランス割合は、少なくとも部分的には、レーダー粒径分析によって測定される。これらBLVのサイズが比較的大きいことを反映し得る。第2図に片対数プロットを示す。この図から、第1列の半減期(点線)および第4列の半減期(実線)が計算された。

第1列を第4列および第7列(投与量レベルの0.2/20)、そして第3列を第6列および第9列(投与量レベル10/100)と比較すると、クリアランス割合に対する負に帶電したリン脂質(PG)の顕著な効果が示されるが、コレステロールの存在による効果はほとんどない。上で示唆したように、PGの効果は、少なくとも部分的には、PG含有リボソームで観察された小さなサイズによるものである。しかしながら、EPG BLVに対して測定された半減期(第10列)は、5モル%または10モル%PGのいずれかを含有するBLV(それぞれ、第6列または第9列)と比較すると、リボソームサイズに関係するように思えないPG濃度の強い効果を示している。

実施例V

IM注射部位からの ^{131}I -sCTクリアランスに対する

リボソームサイズ、投与量、およびリボソーム組成物の効果

筋肉内(IM)注射部位からのリボソームに被包された ^{131}I -sCTのクリアランス割合は、実施例Ⅳで述べた手順と同様の手順により、注射部位における ^{131}I -sCTの保持を測定することによって決定された。実施例Ⅳで述べた脂質組成物A、B、DおよびEの1つを有する HLVを、0.2、2または10マイクロモル脂質の選択された投与量で動物に注射した。これらの HLVには、約0.5 μg の ^{131}I -sCTが被包されており、 ^{131}I -sCTの比放射能は約 $1 \times 10^6 \text{ cpm}/0.5 \mu\text{g}$ であった。選択の ^{131}I -sCTは、リボソーム懸濁液から遠心分離によって取り除いた。注射後、78時間～8日間の試験期間中にわたる間隔のある時点で一对の動物を殺し、これらの動物の注射された肢、および数多くの器官における放射性 ^{131}I -sCTの保持を、上の実施例Ⅳで述べたように測定した。注射された動物のうち2匹は、試験期間中の尿および糞便による ^{131}I -sCTの排泄をモニターした。

典型的な実験の結果を第4図に示す。上方の曲線(丸印)は、注射部位における ^{131}I -sCTの保持を表し、中間の曲線(三角印)は、試験期間中に動物によって排泄された累積放射能を表す。明らかに、初期に注射された ^{131}I -sCTの約70～80%は、この実験の70時間後に排泄される。血液への ^{131}I -sCTの脂質クリアランスは、下方の曲線(四角印)によって示される。

組成物の顕著な効果も表している。HLV中(組成物BおよびD)にPGが存在すると、トレーラー脂質に対して見出されたことと同様に、投与量が等しい2つのPG非含有HLV(組成物AおよびE)よりもクリアランス割合が非常に小さくなつた。また、PG非含有脂質にコレステロールを添加すると、 ^{131}I -sCTのクリアランス割合が著しく増加した。これは、第2列と第6列、および第3列と第7列を比較すると明らかである。ここで、第2列と第6列は投与量2/100に関する、第3列と第7列は投与量10/100に関する。

^{131}I 投与された標的物と50投与された標的物のクリアランス半減期が同程度であるということに注目しなければならない。例えば、クリアランスのIM半減期が20.5時間および9.7時間である標的物の50半減期は、それぞれ19.4時間および8.3時間である。

以下の表Vは、脂質トレーラーに関して、実施例Vの ^{131}I -sCTクリアランス割合の少しだと、表Ⅳの対応する割合を比較したものである。興味あることに、すべての脂質組成物、および比較データを利用し得る投与量に対して、 ^{131}I -sCT割合は脂質トレーラーの約半分である。この発見は、リボソームが不安定化され、その被包成分を主に注射部位で放出し、そして注射部位からの脂質クリアランスが、異なつた、より緩慢な様子によって取り扱われることを示唆している。

(以下余白)

^{131}I -sCT保持 データを第5図に示すように片対数形式でプロットすると、結果は直線プロットになる。このプロットから、クリアランス半減期が決定され得る。図に示した例では、半減期は約8時間である。調べた4つの脂質組成物および2つの脂質投与量に対して、このように測定された半減期データは、以下 表Vに与えられている。すべての研究において、HLVは、あらかじめ 1.0の小孔ポリカーボネット膜に通して押し出すことによってサイズが調整されているが、さらに小孔が小さい膜に通して押し出されなかった。

表IV

投与量	組成物	($\mu\text{mole}/\text{vol}$)	半減期
2/100	A	0.2/20	21.3
2/100	A	2/100	25.9
10/100	A	10/100	55.4
2/200	B	0.2/20	11.1
10/100	D	10/100	8.4
2/100	E	2/100	47.7
10/100	E	10/100	65.8

第1列～第3列のデータ、および第6列～第7列のデータは、IM部位からの ^{131}I -sCTクリアランスに対する全脂質投与量の効果を示している。トレーラー脂質のクリアランスに対して観察されたことと同様に、0.2～10マイクロモル脂質の範囲にわたって全脂質投与量が増加すると、 ^{131}I -sCTのクリアランス半減期が2～3倍増加した。

これらのデータは、 ^{131}I -sCTのクリアランス割合に対する脂質

表V

組成物	投与量	クリアランス半減期	半減期
A	0.2/20	21.3	48.7
A	2/100	20.6	57.6
A	10/100	55.4	110.7
B	0.2/20	11.7	33.3
D	10/100	8.4	17.7

実施例VI

小さなHLVからの ^{131}I -sCT放出に対する添加された空のリボソーム

HLV: α -Tを99:1で、かつ被包された ^{131}I -sCTを含む逆流免小胞(RBC)を標準的な PBS 手順(Sokka)に従って調整した。これらの小胞は、0.4 μm および 0.2 μm のポリカーボネットフィルターに通して押し出し、被包されていない ^{131}I -sCTは、遠心分離を行い、PBS中で3回洗浄することによって小胞懸濁液から取り除いた。次いで、標的物は0.22ミクロンの液面フィルターに通して通過した。

同一組成の空の HLVを調製し、実施例Ⅳで述べたように無菌条件下で1:10のフィルターに通して押し出した。PBSを1:50のモル比で HLVと混合し、各IM注射が10マイクロモルの全脂質中に約 $1 \times 10^6 \text{ cpm}$ の ^{131}I -sCTと約 0.5 μg の ^{131}I -sCTを含むようにした。リボソームの混合物は注射前に1液放送して蒸発させた。実施例Ⅳで述べられたように、リボソーム混合物または PBSをラットに皮下注射した。注射部位からの ^{131}I -放射線のクリアランスは、実施例Ⅳで述べたように、

片対数プロットによって決定した。 RLVのみの場合、および RLVに空の LVを加えた場合、半減期データを図1に示す。

— 1 —

組成物	リボソームの構成	投与量 (μ mole/100 μ l)	半減期
A	REV	0.2	7.2
A	REV + MLV	10.0	41.9
A	MLV	10.0	55.4

明らかのように、空の MLV を 0.2ミクロンの BEV に添加すると、BEV からの CTクリアランスの半減期が 5 倍より大きくなり増加した。表中の第 3 列は、MLVのみからの CT放出に対する CTクリアランスの半減期を与える（実施例 IV のように）。第 2 列および第 3 列を比較すると、ペプチド含有リボソームのサイズは、空のリボソームのサイズおよび／または量と共に、この部位からのペプチド放出割合に影響を与えることが示される。

本発明の好ましい実施態様は、ここに述べられているが、本発明から逸脱することなく、様々な変化および変更を行ってすることは明白である。特に、本発明の一般的原理を例証するためにはCTのリボソーム供給が用いられているが、他のリボソーム不透性化合物についても同様の放出特性が観察されることは自明である。

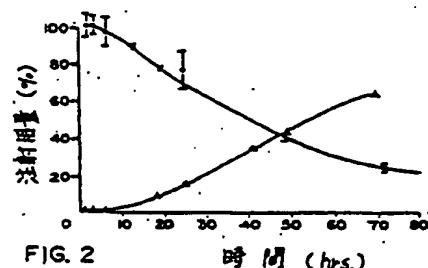
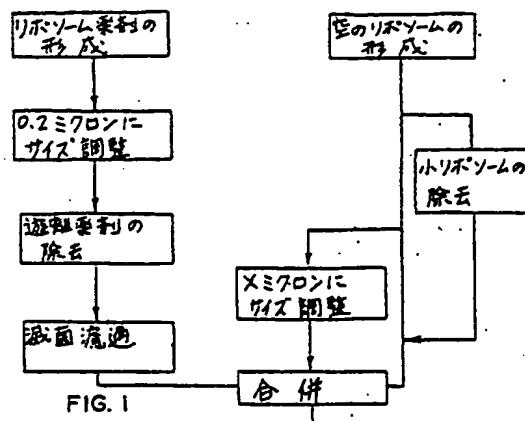


FIG. 2. *Male* (bars).

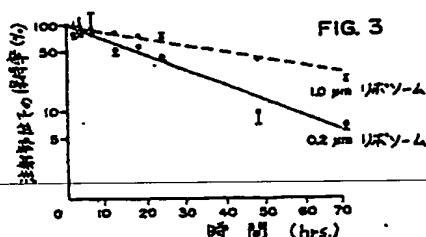
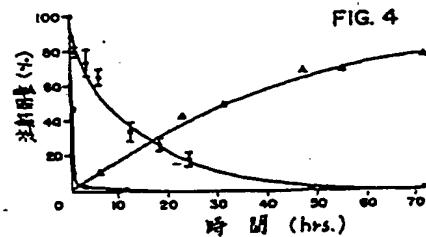
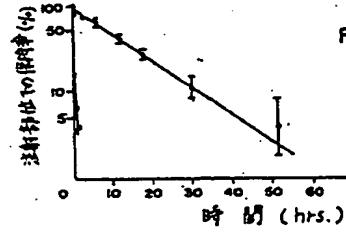


FIG. 3



816



Attachment to Form PCT/ISA/210, Part I.

INT. CL⁴: B01J 13/02; B32B 5/16, 9/02, 9/04

PAPERS REFERENCED SEPARATELY FROM THE TRADE SHOW	
Chemical Abstracts, Volume 90, No. 7, issued 15 April 1988 (Columbus, Ohio, USA); Lang et al., "Increasing the tumor uptake of liposomally entrapped substances by parent injection of empty liposomes", see page 305, column 1, abstract No. 580060, ICS Med. Sci., Libr. Compend. 1988, 11(9), 420-1 (Drug).	
<input type="checkbox"/> DISCLOSURE OF TRADE SHOW CLAIMS WHICH WERE PUBLISHED IN PAPERS The referenced article report has not been published in any of the above-mentioned journals or in the following journal: <input type="checkbox"/> Cancer Research (Because this article is deemed to be relevant to the disclosure, it is included in this disclosure, anyway)	
<input type="checkbox"/> Other journals (Because they refer to some of the referenced publications but do not directly with the present disclosure) None of these are relevant to the present disclosure and are therefore not included in this disclosure.	
DISCLOSURE OF TRADE SHOW CLAIMS OR INFORMATION IN LECTURES The referenced disclosure, which refers disclosure in the present disclosure as follows:	
<input type="checkbox"/> An alternative disclosure from one lecture and in the original, but unpatented, work done at another, other than the referenced disclosure. <input type="checkbox"/> An alternative disclosure from work done by the author(s) and unpatented work, report given at any other source, of the referenced disclosure for which that work was, specifically, done. <input type="checkbox"/> An alternative disclosure that was freely sold by the author(s), disseminator(s), or distributor(s) and is subject to the disclosure that unpatented disclosure is given by this disclosure. <input type="checkbox"/> An alternative disclosure which refers disclosure as mentioned in the referenced disclosure, author(s) and the disclosure of the referenced disclosure. <input type="checkbox"/> The disclosure(s) have been reproduced by another's work. <input type="checkbox"/> An article comprising the subject of the present disclosure.	
PCT/ISA/210 (Supplemental Form 10 (After 1990))	